

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANALISIS BIOAUTOGRAFI KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS EKSTRAK ETANOL DAUN SRIKAYA (*ANNONA SQUAMOSA L*) TERHADAP *ENTEROCOCCUS FAECALIS* SECARA IN VITRO

Isti Daristivia Jangnga*, Portuna Putra Kambaya*, Khemasili Kosala*

Keywords:

Srikaya leaves,
Enterococcus faecalis,
Kirby Bauer diffusion
disk, Bioautography
TLC, Secondary
metabolite.

ABSTRACT

Background: Endodontic treatment is a treatment to maintain teeth that have undergone pulp or periapical infections to stay as long as possible in the oral cavity and restore them to their original form and function in the mastication system. The main causes are bacteria *Enterococcus faecalis*. The purpose of this study is to investigate the effect of extract srikaya leaves on the growth of *Enterococcus faecalis* bacteria in vitro and to analyze secondary metabolites that have antibacterial activity.

Method: Experimental study used Kirby Bauer diffusion test. The research design was post test only control group design and Bioautography TLC design. There was 5 treatment groups : concentration 25%, 50%, 75% extract of ethanol of srikaya leaves, positive control group (chlorhexidine gluconate 0,2%), and negative control group (DMSO 10%). Statistical analysis used One Way Anova and Post Hoc Test Tukey.

Results: Extract of Srikaya Leaves can inhibit the growth of *Enterococcus faecalis* bacteria in concentrations of 25%, 50%, and 75% and detectable secondary metabolites show inhibit zone.

Conclusion: The extract of ethanol leaves of srikaya (*Annona squamosa L*) have the effect of inhibiting the growth of *Enterococcus faecalis* bacteria and secondary metabolites have effect in inhibiting bacterial growth.

PENDAHULUAN

Perawatan endodontik merupakan upaya perawatan untuk mempertahankan gigi yang telah mengalami infeksi pulpa atau periapikal agar berada selama mungkin di dalam rongga mulut dan merestorasinya hingga dapat kembali ke bentuk dan fungsinya semula dalam sistem mastikasi.¹ Perawatan endodontik terbagi atas tiga tahapan utama, yaitu preparasi biomekanis saluran akar atau pembersihan dan pembentukan (*cleaning and shaping*), disinfeksi saluran akar, dan obturasi saluran akar.²

Perawatan endodontik disebabkan oleh infeksi primer maupun infeksi sekunder yang disebabkan adanya kolonisasi mikroorganisme yang didominasi oleh bakteri anaerob

khususnya *Enterococcus faecalis* sekitar 77 % dalam kegagalan saluran akar.³

Enterococcus faecalis termasuk bakteri anaerob fakultatif yang bersifat oportunistik dan bakteri ini biasa dikaitkan dengan kegagalan perawatan saluran akar, selain ditemukan di dalam saluran akar, bakteri ini ditemukan pada mikrobiota gastrointestinal manusia, dan sebagai penyebab infeksi nosokomial terbanyak.⁴

Disinfeksi dalam hal ini adalah irigasi saluran akar dan pemberian medikamen yang tepat. Namun dalam kondisi tertentu, misalnya dalam perawatan dengan waktu yang lama, maka perlu diberikan medikamen di dalam saluran akar untuk menjamin sterilitas hingga saatnya dilakukan pengisian saluran akar. Medikamen tersebut diharapkan

*Staf Pengajar Program Studi Pendidikan Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman
Korespondensi: istidaristivia29@gmail.com

dapat berpenetrasi ke dalam tubulus dentin dan membunuh bakteri, sehingga syarat dari medikamen saluran akar yaitu harus memiliki aktivitas antibakteri, menetralkan sisa-sisa debris di saluran akar, mengontrol nyeri pascarawat, mampu mencegah reinfeksi, dan bersifat biokompatibel.⁵

Dalam perkembangan bahan medikamen saluran akar di kedokteran gigi, selain menggunakan bahan kimia pemanfaatan bahan alami untuk pengobatan dapat digunakan sebagai alternatif bahan medikamen saluran akar. Di dalam bahan alami tersebut terdapat kandungan terpenoid, alkaloid, flavonoid, dan fenolik berpotensi sebagai antibakteri dan antijamur.⁶

Daun srikaya (*Annona squamosa* L.) merupakan bahan alami yang dapat dikembangkan untuk dilakukan suatu uji sebagai bahan medikamen. Penelitian sebelumnya telah dilakukan oleh Pristi (2013), terhadap daun srikaya dengan menggunakan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% untuk menguji aktivitas antibakteri pada bakteri *Escherichia coli*.^{7,8}

Data aktivitas daun srikaya terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* sampai saat ini belum ada, sehingga peneliti tertarik untuk mengetahui dan menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap *Enterococcus faecalis* secara in vitro dan menganalisis senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri didalamnya.

METODE PENELITIAN

Tahap penelitian pertama yaitu uji antibakteri, penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan desain *post test only control group*. Uji yang digunakan yaitu *disc diffusion* (*Kirby bauer test*) untuk menguji respon pertumbuhan bakteri terhadap agen

antibakteri. Protokol penelitian ini sudah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman.

Penelitian ini menggunakan media *Mueller-hinton Agar (MHA)*, *Mueller-hinton Broth (MHB)*, *blank disc* dari OxoidTM berdiameter 6 mm, sediaan bakteri *Enterococcus faecalis* (Standar ATCC), *Chlorhexidine gluconate* 0,2% dari MINOSEP[®], etanol 96%, petridish, rotary evaporator, kertas saring Wathman[®] no.42, digital caliper dari TRICLE BRAND[®], spektrofotometer, kapas lidi steril, DMSO 10%, untuk mengetahui metabolit sekunder menggunakan Plat KLT yang berupa aluminium dengan bahan penyemprot yaitu Aluminium chloride (AlCl₃), dragendorf, anisaldehyd asam sulfat, lalu plat difoto dibawah lampu UV 254 nm dan 365 nm dan untuk mengetahui Bioautografi KLT agar overlay menggunakan plat KLT aluminium yang diletakkan pada bagian bawah media agar *Mueller-hinton Agar (MHA)*, lalu dilakukan penyemprotan *tertrazolium dye*.

Penelitian ini menggunakan daun srikaya (*Annona squamosa* L) yang tampak segar dan sehat. Identifikasi subyek tumbuhan dilakukan oleh ahli taksonomi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mulawarman. Daun srikaya dipetik sebanyak 2,5 kg dilakukan pencucian dengan air hingga bersih, ditiriskan, dan selanjutnya daun srikaya dimasukkan ke dalam lemari pengering selama 1 minggu untuk dikeringkan. Pembuatan ekstrak menggunakan cara maserasi. Daun srikaya yang telah dikeringkan, dipotong dan dimasukkan ke dalam wadah kaca yang telah diberi larutan etanol 96% sampai daun terendam seluruhnya. Wadah tersebut ditutup rapat dan didiamkan selama ±2 hari sambil dilakukan pengocokan satu kali setiap hari. Hasil yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman[®] no.42,

selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan alat rotary evaporator yang hasilnya ekstrak menjadi kental, selanjutnya didapatkan ekstrak pekat dikeringkan lebih lanjut dalam oven suhu 60°C.

Tahapan penelitian terdiri dari tiga tahapan. Tahap awal adalah persiapan *Enterococcus faecalis*. Bakteri di kultur menggunakan media MHB. Bakteri *Enterococcus faecalis* yang digunakan dengan kepekatan McFarland 0,5 atau setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Tahapan kedua adalah uji *disc diffusion*. *Blank disc* direndam ekstrak etanol daun Srikaya (*Annona squamosa* L), masing-masing konsentrasi 25%, 50%, dan 75%, sebagai kontrol digunakan *Chlorhexidine gluconate* 0,2%, dan DMSO 10 %. Sebanyak 100 µl suspensi bakteri diapus secara merata pada permukaan media MHA agar. Disk diletakkan pada lempeng agar yaitu disk ekstrak etanol daun srikaya berbagai konsentrasi, *Chlorhexidine gluconate* 0,2% dan DMSO 10 %, selanjutnya Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di inkubator.

Tahap terakhir penelitian adalah pengukuran diameter zona hambat menggunakan digital caliper. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan secara horizontal dan vertikal kemudian dirata-ratakan.

Penelitian kedua dilakukan penelitian skrining fitokimia dengan pemantauan KLT. Plat KLT dipotong sesuai dengan kebutuhan, lalu dimasukkan kedalam inkubator yang mempunyai suhu 110°C dalam posisi tegak selama 30 menit. Senyawa yang diidentifikasi adalah senyawa flavanoid, alkaloid, dan terpenoid. Masing masing plat KLT dimasukkan dalam beaker glass yang pertama flavanoid yaitu plat KLT dimasukkan didalam beaker glass dengan berisi campuran butanol : etil asetat : air (4:1:5), alkaloid berisi campuran etil asetat : metanol : air (6:4:2), terpenoid berisi campuran

n-heksan: etil asetat : air (4:1). Setelah proses pengelusian selesai plat diangkat flavanoid disemprot dengan pereaksi Alumunium Chloride ($AlCl_3$), alkaloid disemprot dengan pereaksi dragendorf, terpenoid disemprot dengan pereaksi anisaldehyd asam sulfat lalu dimasukkan ke dalam inkubator dikeringkan pada suhu 110° C selama 5-10 menit, noda terlihat berwarna kuning menunjukkan adanya senyawa flavanoid, berwarna jingga yaitu alkaloid, sedangkan terpenoid berwarna merah-ungu.

Penelitian ketiga dilakukan penelitian Bioautografi KLT agar overlay dengan plat KLT yang sebelumnya sudah dilakukan elusi ekstrak etanol daun srikaya lalu setelah itu plat KLT ditanam pada Media agar, selanjutnya sebanyak 100 µl suspensi bakteri diapus secara merata pada permukaan media MHA agar Mueller- Hinton Agar (MHA). Setelah itu di inkubasi dengan suhu 37o C dalam waktu 24 jam di inkubator, selanjutnya dilakukan penyemprotan menggunakan tetrazolium dye untuk melihat adanya zona hambat bakteri.

Analisa data menggunakan program SPSS for MACintosh® Version 23.0. Uji statistik dengan *Shapiro-Wilk*, dan uji *One-way Anova* serta uji *Post Hoc Tukey*

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian pertama uji antibakteri menunjukkan adanya diameter zona hambat pada ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) dan *Chlorhexidine gluconate* 0,2% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Pengukuran diameter zona hambat pada Kontrol Negatif DMSO 10 % yang digunakan penelitian ini tidak menunjukkan adanya zona hambat (Gambar 1). Pada Kontrol Positif

Chlorhexidine gluconate 0,2% didapatkan zona hambatan $13,71 \pm 0,18$ mm (Tabel 1).

Uji statistik dengan *One-way Anova* memperlihatkan nilai $p < 0,05$ untuk kelompok ekstrak etanol daun terdapat perbedaan luas zona hambat yang signifikan antara masing-masing konsentrasi ekstrak $p < 0,05$ (Tabel 1).

Lalu dilanjutkan dengan *Post Hoc test*, *Least Significant Difference (LSD) test* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan

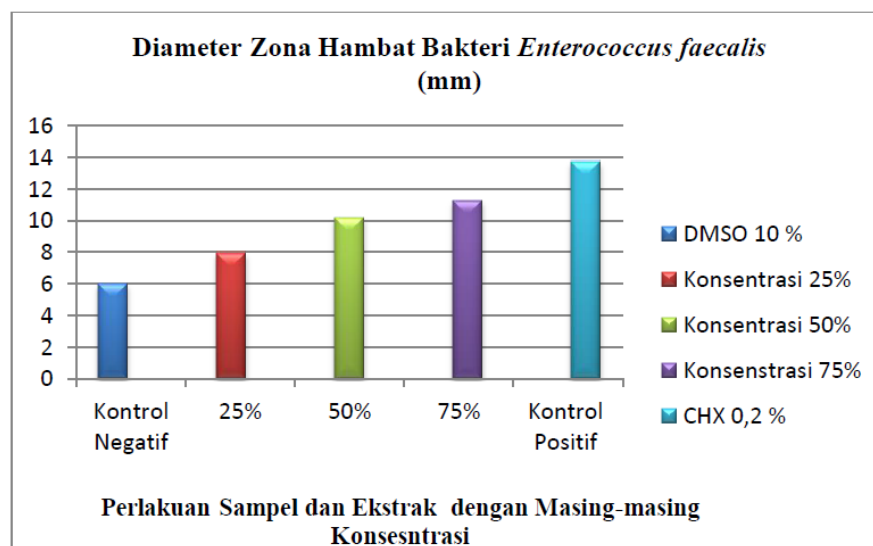
antar tiap individu perlakuan. Hasil uji untuk kelompok ekstrak etanol daun srikaya konsentrasi 25%, 50%, dan 75% dan kontrol positif memperlihatkan nilai $p < 0,05$ terhadap semua kelompok terdapat perbedaan luas zona hambat yang signifikan.

Pada penelitian kedua skrining fitokimia dengan menggunakan plat KLT. Hasil skrining fitokimia memperlihatkan ekstrak etanol daun srikaya mengandung metabolit sekunder yaitu

Tabel 1 . Diameter Zona Hambat (mm) Ekstrak Etanol Daun Srikaya (*Annona squamosa* L.) Terhadap Bakteri *Enterococcus faecalis*.

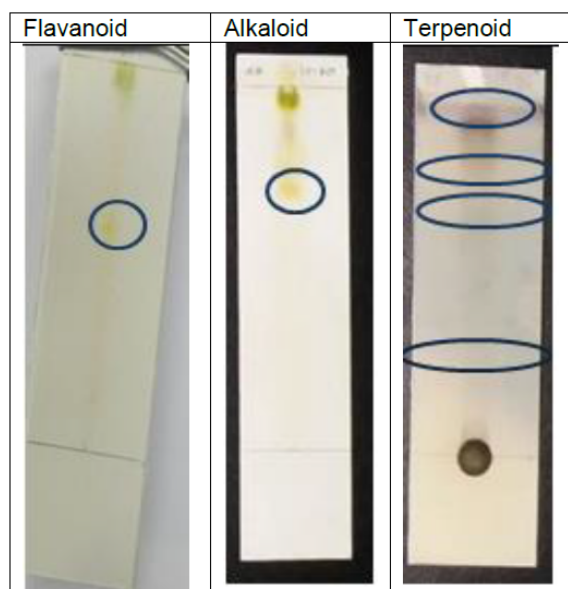
Jenis Perlakuan	Konsent-rasi Ekstrak	Mean \pm SE (Sebelum dikurangi diameter <i>disc</i>)	P- Value
Ekstrak Etanol Daun	25%	7,95 \pm 0,351	0.000
	50%	10,18 \pm 0,204	0.000
	75%	11,27 \pm 0,804	0.000
Kontrol Positif		13,71 \pm 0,182	0.000

Keterangan: pengulangan dilakukan lima kali, data disajikan dalam bentuk SE \pm Mean. Diameter disc 6 mm. Kontrol positif (*Chlorhexidine gluconate* : 0,02%).

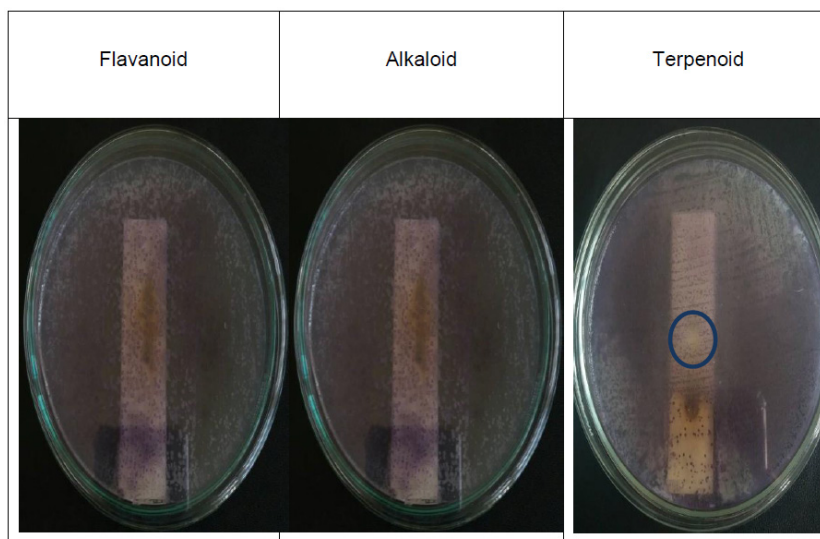


Keterangan: Data disajikan dalam bentuk mean sebelum dikurangi 6mm. Kontrol Negatif = DMSO 10%, Kontrol Positif = *Chlorhexidine gluconate* 0,2%.

Gambar 1. Zona Hambat (mm) Bakteri *Enterococcus faecalis* pada Masing-masing perlakuan.



Gambar 2. Skrining fitokimia kromatografi lapis tipis Ekstrak Etanol Daun Srikaya (*Annona squamosa L*)



Gambar 3. Bioautografi Overlay kromatografi lapis tipis Ekstrak Etanol Daun srikaya (*Annona squamosa L*)

flavanoid, alkaloid, dan terpenoid (Gambar 2). Flavanoid ditandai dengan nilai R_f 0,55 mempunyai 1 noda, alkaloid ditandai dengan R_f 0,70 mempunyai 1 noda dan terpenoid ditandai dengan R_f 0,92, 0,75, 0,63, dan 0,36 yang mempunyai 4 noda.

Pada penelitian ketiga menggunakan Bioautografi KLT agar overlay pada kelompok flavanoid dan alkaloid yang sudah disemprot dengan larutan *tertrazolium dye* tidak terlihat adanya zona hambat, sedangkan untuk terpenoid yang sudah disemprot dengan

tertrazolium dye terdapat adanya sebuah noda yang menunjukkan adanya zona hambat pada R_f 0,36, ini menunjukkan bahwa terpenoid mempunyai daya hambat antibakteri. Dapat dilihat pada (Gambar 3).

DISKUSI

Hasil penelitian mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa L*) menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap

pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Hasil penelitian ini dibuktikan dengan adanya daerah bening pada semua konsentrasi ekstrak yang diberikan perlakuan. Kategori kekuatan daya antibakteri berdasarkan zona hambat dalam metode *disc diffusion* diinterpretasikan dengan kriteria Davis dan Stout (1971). Zona hambat pada ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) dengan masing-masing konsentrasi 25%, 50%, dan 75% terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* didapatkan bahwa konsentrasi 25% dan 50 % memiliki aktivitas antibakteri lemah sedangkan konsentrasi 75 % memiliki aktivitas antibakteri yang sedang.

Penelitian tentang bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap daun srikaya baru pertama kali dilakukan. Setelah dilakukan penelitian, pada bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap daun srikaya memiliki efek zona hambat antibakteri. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri gram positif. Penelitian ini didukung oleh penelitian Alberta (2016) yang menyatakan ekstrak etanol daun srikaya dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus*. Penelitian pendukung lainnya yang telah dilakukan Pristi (2013) menunjukkan ekstrak daun srikaya mempunyai daya hambat antibakteri terhadap bakteri gram negatif (*Klebsiella pneumoniae*).⁷

Diameter zona hambat ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) mengalami peningkatan sesuai dengan peningkatan konsentrasi ekstrak yang telah diuji. Daya hambat tertinggi berada pada konsentrasi 75%. Semakin besar konsentrasi, zona hambat yang terbentuk maka semakin kuat, yaitu menandakan bahwa senyawa bioaktif menghambat pertumbuhan bakteri.

Beberapa senyawa aktif antibakteri yang terkandung dalam tanaman ini juga telah

banyak diteliti antara lain senyawa flavanoid, alkaloid, terpenoid saponin, tannin, karbohidrat, protein, pitosterol dan asam amino.¹⁰ Berdasarkan hasil penelitian daun srikaya (*Annona Squamosa* L.). Menurut beberapa penelitian salah satunya yang dilaporkan oleh Alberta (2016) bahwa alkaloid, flavonoid, dan terpenoid memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.⁹

Senyawa flavonoid merupakan salah satu golongan fenol yang terbesar, flavonoid berperan secara langsung dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme bakteri. Mekanisme kerja dari senyawa flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri memiliki beberapa fungsi yaitu menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas pada dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom, senyawa flavonoid mampu melepaskan energi transduksi terhadap membran sitoplasma bakteri dan menghambat pergerakan bakteri secara spontan dan aktif.⁷

Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri terhadap peptidoglikan pada dinding sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel.⁷

Terpenoid memiliki aktivitas sebagai antibakteri yaitu menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri dengan mengganggu proses pembentukan dinding sel, dimana dinding sel bisa saja tidak terbentuk atau pembentukan menjadi tidak sempurna.⁷

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun srikaya yang mengandung metabolit sekunder pada daun srikaya (*Annona squamosa* L.) yaitu flavanoid, alkaloid, terpenoid memiliki aktivitas antibakteri.

Penelitian kedua dilakukan penelitian skrining fitokimia untuk melihat jenis metabolit sekunder di dalam ekstrak etanol daun srikaya

(*Annona squamosa* L). Pada penelitian ini jenis metabolit sekunder yang diteliti adalah flavanoid, alkaloid, dan terpenoid. Skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Keuntungan dalam penggunaan kromatografi lapis tipis yaitu adalah lebih murah dan tata cara pengerjaan lebih mudah dibandingkan dengan beberapa jenis kromatografi yang telah ada.¹¹

Identifikasi dilakukan pada ketiga senyawa dan didapatkan bahwa pada daun srikaya mengandung tiga senyawa yaitu senyawa flavanoid, alkaloid, dan terpenoid. Identifikasi senyawa flavanoid pada ekstrak timbul noda berwarna kuning setelah disemprot dengan pereaksi noda $AlCl_3$. Penelitian yang dilakukan Abdul malik dkk. (2016), hasil yang didapatkan pada identifikasi senyawa flavanoid ekstrak daun *Celosia argentea* L adalah timbulnya bercak kuning pada plat KLT setelah disemprot dengan pereaksi penampak noda $AlCl_3$.¹²

Senyawa alkaloid pada ekstrak timbul noda berwarna jingga setelah disemprot dengan pereaksi dragendorff, penelitian ini didukung oleh Adeane dkk. (2018), hasil yang didapatkan pada senyawa alkaloid ekstrak daun *Annona muricata* L setelah disemprot dengan pereaksi dragendorff timbulnya bercak berwarna jingga.¹³

Identifikasi senyawa terpenoid pada ekstrak timbul noda berwarna ungu setelah disemprot dengan pereaksi anisaldehyd asam sulfat. Penelitian ini di dukung oleh Arundina dkk. (2015) pada ekstrak daun *Artemisia vulgaris* L menunjukkan noda berwarna ungu ketika disemprotkan dengan pereaksi penampak noda anisaldehyd asam sulfat.¹⁴

Penelitian yang ketiga selanjutnya dilakukan analisis bioautografi KLT senyawa antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode bioautografi-KLT. Pada penelitian ini

digunakan metode bioautografi KLT. Diperoleh pemindahan senyawa aktif kedalam medium agar yang lebih baik dan dapat dibedakan antar senyawa aktif berdasarkan nilai R_f -nya. Dari hasil penelitian didapatkan ada satu noda memiliki zona hambat pada kelompok terpenoid, yang teridentifikasi dengan R_f 0,36 sementara pada kelompok flavanoid dan alkaloid tidak ditemukan adanya zona hambat. Hal ini menunjukkan pada metabolit sekunder yang teridentifikasi yakni flavanoid, alkaloid, dan terpenoid secara terpisah memberikan aktivitas antibakteri yang kecil. Pernyataan ini didukung oleh Kusmardiyani (2012) bahwa daun srikaya pada metode KLT menghasilkan suatu bercak berwarna merah-ungu sehingga dapat disimpulkan daun srikaya memiliki kandungan terpenoid.¹⁵ Pernyataan ini didukung juga oleh Salni dengan metode Bioautografi menunjukkan hasil terpenoid dapat menghambat bakteri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁶

Pada penelitian ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L) mempunyai aktivitas antibakteri yaitu bakteri *Enterococcus faecalis*, hal ini terkait dengan metabolit sekunder yang terkandung yakni flavanoid, alkaloid, dan terpenoid secara sinergis mempunyai aktivitas antibakteri dengan zona hambat, namun secara terpisah aktivitas antibakteri pada masing-masing metabolit sekunder menjadi lemah. Hal ini disebabkan bahwa noda yang bergerak setelah ditarik oleh eluen memiliki konsentrasi yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak, sehingga kekuatan aktivitas antibakteri menjadi lebih lemah.¹⁷

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pengolahan data yang sudah dilakukan peneliti, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L) memiliki aktivitas menghambat terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*.
2. Metabolit sekunder dalam ekstrak etanol daun srikaya yaitu terpenoid memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Farmakologi dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman Program Studi Pendidikan Kedokteran Gigi Universitas Mulawarman yang telah memberikan sarana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nugroho, R. Perawatan Endodontik-Restorasi Pada Kerusakan Gigi Anterior Secara Efektif Efisien Dan Estetik. *The Indonesian Journal Of Health Science*; 2013;78-79.
2. Chandra B. Suresh ; Gopikrishna, V. *Grossmans Endodontic Practice-13th Edition*. India: Wolters Kluwer Health; 2014.
3. Torabinejad, M., & Walton, R. E. *Endodontics Principles And Practice (4nd Edition Ed.)*. (W. I. Drive, Ed.) Saunder Elseviers; 2009.
4. Fahrudin, A. M., Tatengkeng, F., & Thamrin, R. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Buah Patikala (*Etilingeraelator* (Jack) R.M. S.M) Terhadap Bakteri *Enterococcus Faecalis*. *Makassar Dent J*; 2016; 69-75.
5. Happasalo, M., & Qian, W. *Irrigant and intracanal medicament*. BC Decker Inc, Hamilton: Ingle JI, Bakland JK; 2008.
6. Tansil, A. Y., Nangoy, E., Posangi, J., & Bara, R.A. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Srikaya (*Annona Squamosa*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escheichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. *E-Biomedik (Ebm)* 4,juli-Desember; 2016.
7. Pristi, M., & Yunikawati, A. Efektifitas Perasan Daun Srikaya Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli*. *Indonesia Medicus Veterinus*; 2013.
8. Taufiq, S., Yuniarni, U., & Hazar, S. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*Carica Papaya* L) Terhadap *Escherichia Coli* Dan *Salmonella Typhi*. *Prosiding Penelitian Sivitas Akademika Unisba (Kesehatan Dan Farmasi)*; 2015.
9. Alberta, T. Y., Edward, N., Jimmy, P., & Robert, B. A. . Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Srikaya (*Annona Suamosa*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal E-Biomedik*; 2016.
10. Barve B, & Pandey N. *Phytochemical And Pharmacological Review On Annona Aquamosa Linn*. *International Jouranl Of Research In Pharmaceutical And Biomedical Science*; 2014.
11. Gandjar, I. G., & Rohman, A. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2007.
12. Abd., M., Edward, F., & Waris, R. Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Metanolik Herba Broco (*Celosia Argentea* L). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*; 2016.
13. Adeanne, W. C., Schadu, J., & Andriani, W. N. (2018'). *Identifikasi Alkaloid Pada Daun Sirsak (Annona Mucriata L)*. *Jurnal Farmasi Politeknik Kesehatan Kemenkes Manado*;2018.
14. Arundina, I., Theresia, I. B., Luthfi, M., & Indrawati, R. *Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis Sudamala (Arterimisia Vulgaris L)*. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*; 2015.
15. Kusmardiyani, S., Wandasari, F., & Wirasutisna, K. R. *Telaah Fitokimia Daun Srikaya (Annona squamosa L.) yang Berasal dari Dua Lokasi Tumbuh*. *Acta Pharmaceutica Indonesia*; 2012.
16. Salni, Harmida, & V. M. *Penapisan Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Famili Annonaceae*. *Jurnal Penelitian Sains*; 2007.
17. Safitri, A. *Sidik Jari Kromatografi Lapis Tipis, Aktivitas Antioksidan Dan Antibakteri Rimpang, Batang, Dan Daun Curcuma aeruginosa*; 2016.